

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenl gungsschrift
⑩ DE 40 03 783 A 1

⑤ Int. Cl. 5:
C07 F 9/10
A 61 K 9/127
// (A61K 9/127,
31:685)

⑳ Aktenzeichen: P 40 03 783.5
㉔ Anmeldetag: 8. 2. 90
㉕ Offenlegungstag: 14. 8. 91

DE 40 03 783 A 1

㉗ Anmelder:
A. Nattermann & Cie GmbH, 5000 Köln, DE

㉘ Erfinder:
Ghyczy, Miklos, Dr.; Röding, Joachim, Dr., 5000
Köln, DE; Lautenschläger, Hans, Dr.; Hameister,
Walter, Dr., 5024 Pulheim, DE; Hager, Jörg, 5000
Köln, DE

DERER, KELLER & RIEDERER
EINGANG / RECEIPT
28.FEB.2000

Erl:

⑤4 Neues phospholipidhaltiges Gel

⑤7 Die Erfindung betrifft ein phospholipidhaltiges Gel und ein
Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung für
die Herstellung liposomaler Lösungen.

DE 40 03 783 A 1

Die Erfindung betrifft ein phospholipidhaltiges Gel und ein Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung für die Herstellung liposomaler Lösungen.

Gele sind Materialien oder Zusammensetzungen, die in vielen technologischen Gebieten eine breite Anwendung finden, wie z. B. in der Lebensmittelindustrie, der Kosmetik und Pharmazie, der Photographie oder bei analytischen Methoden wie den chromatographischen Trennungsvorverfahren.

Gele werden im allgemeinen als hochviskose oder unendlich viskose Masse betrachtet, in denen ein kettenvernetztes makromolekulares System vorliegt.

Sehr oft ist die eigentliche Gel-Struktur selbst jedoch nicht geklärt, auch wenn eine mehr oder weniger viskose Masse als Gel betrachtet oder gekennzeichnet wird.

Die am meisten bekannten und weitverbreiteten Gele sind die wäßrigen Gele, in denen Wasser als immer vorhandene Hauptkomponente verwendet wird. Es wird dann eine Verbindung hinzugefügt, die die Gelbildung bewirkt und die Stärke der Erstarrung beeinflußt. Als bevorzugtes Material für die Erzeugung eines Gels wird Gelatine verwendet.

Bekannt sind auch die sog. Organogele, in denen die flüssige Hauptkomponente ein organisches Lösungsmittel ist und ein zugesetztes apolares Polymer die Gelierung verursacht und ihre Stärke beeinflußt.

So beschreibt die PCT/VO 86/02 264 ein System aus umgekehrten Micellen, das durch Zugabe von geeigneten Lösungsmitteln, wie z. B. Squalen, Miglyol oder Pflanzenölen in entsprechende Gele überführt werden kann. Eine pharmazeutische Verwendung ist nicht möglich.

Für eine pharmazeutische Anwendung kommen naturgemäß nur solche Gele in Betracht, die ausschließlich aus pharmazeutisch verträglichen Substanzen bestehen. Dabei tritt dann das Problem auf, daß viele in der Pharmazie verwendbare und benötigte Substanzen nicht in der Lage sind, Gele oder Gel-ähnliche Aggregatzustände auszubilden.

Am meisten wurden bisher Systeme untersucht, in denen Gele aus Lecithin oder allgemeinen Phospholipiden, einem Lösungsmittel, Wasser und weiteren benötigten Hilfsstoffen gebildet werden. Solche Gele dienen oft jedoch nur als Zwischenstufe, um im Endeffekt ein Liposomen-Gel zu erhalten oder das gewünschte Endprodukt sind die Liposome selbst.

So wird in der EP-A 01 60 266 eine Liposomen-Zusammensetzung beansprucht, die aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Liposomen und einem Netzwerkmaterial besteht. Für das Netzwerkmaterial werden bevorzugt Polysaccharide verwendet, in dem die Liposome eingebettet sind.

Nach der PCT/VO 85/03 640 werden beladene Liposome in einer Gel-Matrix aus Stärke oder modifizierter Stärke beansprucht.

In der EP-A 00 69 307 wird eine Methode zur Darstellung eines Liposomen-Gels beschrieben, wonach eine wäßrige und lösungsmittelhaltige Lecithinlösung mit Ultraschall behandelt wird. Abhängig von der Beschallungsdauer und -intensität bildet sich ein mehr oder weniger viskoses Gel aus. Durch Verlängerung der Beschallungszeit oder mittels mechanischer Rührwirkung erhält man als Endprodukt eine Liposomen-enhaltende, wäßrige Lösung.

Ein sogenanntes Pre-Liposomen-Gel erhält man aus einem Gemisch von Phospholipiden, Fettsäuren und ei-

nem hydratisierenden Agens (EP-A 02 11 647). Nach Zugabe von Wasser oder Pufferlösung bilden sich Liposome aus.

Ein phospholipidhaltiges, dünnflüssiges Gel wird in der PCT/VO 89/00 077 für die Anwendung als Aerosol-Liposome beansprucht. Das System besteht aus Lecithin, einem organischen Lösungsmittel und wenig Wasser. Hier tritt eine breite Spanne von Liposomendurchmessern im Bereich von 100 bis 2500 nm auf; für einen sinnvollen Anwendungsbereich muß ein hoher Lösungsmittelanteil gewählt werden.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß es möglich ist, aus dem System Phospholipid-Alkohol-Wasser ein Gel zu erhalten, indem nur eine geringe Menge an Lösungsmittel, dem Alkohol, verwendet wird. Im Gel bildet das Wasser eindeutig die Hauptkomponente.

Überraschend ist auch, daß das Gel pyrogenfrei und keimarm ist, und daß es sich auf äußerst einfache Weise in keimarme, pyrogenfreie liposomale Lösungen überführen läßt.

Bevorzugt werden pharmazeutisch verwendbare und physiologisch unbedenkliche Alkohole, wie Ethanol und 2-Propanol verwendet.

Die Herstellung des Gels ist durch ein besonders einfaches Verfahren gekennzeichnet, in dem ein Phospholipidgemisch bestimmter Zusammensetzung mit einer bestimmten Menge an Alkohol kurze Zeit gerührt wird und durch Wasserzugabe und weiteres Rühren die Gelbildung erfolgt.

Das Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß es in jedem handelsüblichen Laborrührer in einem beliebigen geeigneten Gefäß ausgeführt werden kann. Grundvoraussetzung ist lediglich eine genügend große Drehzahl, so daß in kurzer Zeit eine starke Durchmischung erreicht wird.

In der bevorzugten Ausführungsform werden zwei unterschiedliche Phospholipidgemische eingesetzt, wobei die Mengenverhältnisse in folgenden Bereichen liegen:

Phospholipidgemisch A:

80% Phosphatidylcholin
1—19% saure Phospholipide
19—1% sonstige Phospholipide

Phospholipidgemisch B:

60% Phosphatidylcholin
10—30% saure Phospholipide
10—30% sonstige Phospholipide

Als besonders geeignet haben sich natürliche Phospholipidgemische erwiesen, wie sie etwa aus Ölsaaten gewonnen werden können. Hierzu gehören bevorzugt die Sojabohne, Raps, Sonnenblumenöl und andere.

Die aus den Ölsaaten gewonnenen, natürlichen Phospholipidgemische können etwa nach der EP-S 00 69 770 aufgearbeitet werden, wobei man die oben erwähnten Phospholipidgemische A und/oder B erhält. In diesen Gemischen gehören zu den "sonstigen Phospholipiden" etwa Lyso-Phosphatidylcholin und Phosphatidylinosit, während man erfindungsgemäß die Phosphatidsäure, Phosphatidylethanolamin und N-Acyl-Phosphatidylethanolamin zu den sogenannten sauren Phospholipiden rechnet.

Versuche mit anderen als die oben angegebenen Mi-

schungsverhältnisse von A oder B oder mit reinem Phosphatidylcholin führten im übrigen nicht zu den erfindungsgemäßen Produkten.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist auch darin zu sehen, daß für eine evtl. nachfolgend gewünschte Herstellung von Liposomen bzw. liposomaler Lösung keine zusätzlichen energieaufwendigen Schritte, wie Temperaturerhöhung, Ultraschall oder dergl. mehr nötig sind.

Die erfindungsgemäße Gel-Formulierung kann mit einem Gehalt von 5 bis 40 Gewichtsteilen Phospholipiden hergestellt werden. Bevorzugt werden jedoch solche mit 20–30 Gewichtsteilen Phospholipidanteil hergestellt.

Die nach der Erfindung hergestellten Gele besitzen einen Alkoholgehalt von 15 bis 20, typischerweise 16 Gewichtsprozent, so daß der Wasseranteil 44 bis 69 Gew.% beträgt, abhängig von der Menge an Phospholipid in der Endformulierung. Selbstverständlich können anstelle von Wasser auch Pufferlösungen, wie etwa Phosphatpuffer oder physiologische Kochsalzlösung verwendet werden.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert, wobei als Phospholipidgemische die Gemische I oder II mit der folgenden Zusammensetzung verwendet werden (Angaben in Gewichtsprozent).

	Gemisch I	Gemisch II
Phosphatidylcholin	80%	60%
Lyso-Phosphatidylcholin	3%	2%
Phosphatidylethanolamin	6%	19%
Phosphatidsäure		6%
N-Acyl-Phosphatidylethanolamin	9%	5%
Phosphatidylinositol	2%	8%

Beispiel 1

10 g des Gemisches I werden in 8 g Ethanol unter Rühren aufgelöst. Die Lösung besitzt eine Viskosität von 806 mPas (bei 25°C) und ist homogen. Die Lösung wird mit 32 g entmineralisiertem Wasser während 3 Minuten homogenisiert, wobei ein handelsüblicher schnelllaufender Laborrührer verwendet wird. Man erhält ein transparentes Gel mit 20 Gew.% Phospholipidgehalt.

Beispiel 2

Analog Beispiel 1 werden 15 g Gemisch I in 8 g Ethanol gelöst. Die Lösung wird mit 27 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt, bis ein homogenes, transparentes Gel entsteht. Das Gel enthält 30 Gew.% Phospholipide.

Beispiel 3

Analog Beispiel 1 werden 10 g des Gemisches II in 8 g Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 32 g entmineralisiertem Wasser wird 3 Minuten weiter gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 20 Gew.% Phospholipidgehalt.

Beispiel 4

Analog Beispiel 1 werden 20 g des Gemisch I in 8 g

2-Propanol gelöst. Es werden 27 g entmineralisiertes Wasser zugegeben und noch drei Minuten gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 27,5 Gew.% Phospholipidgehalt.

Beispiel 5

Wie in Beispiel 1 werden 10 g des Gemisch I in 8 g 2-Propanol gelöst. Nach Zugabe von 37 g entmineralisiertem Wasser wird 3 Minuten gerührt und man erhält ein transparentes Gel mit 18,2 Gew.% Phospholipidgehalt.

Beispiel 6

Analog Beispiel 1 werden 15 g Gemisch II — anstelle des Gemisch I — in 8 g 2-Propanol gelöst. Nach Zugabe von 27 g entmineralisiertem Wasser und einer Rührzeit von 3 Minuten erhält man ein transparentes Gel mit 30 Gew.% Phospholipidgehalt.

Die nachfolgenden Beispiele zeigen, wie durch einfachste Verfahrensschritte aus dem phospholipidhaltigen Gel keimarme und konservierte liposomale Lösungen erhalten werden können. Bei allen Endprodukten liegt die Keimzahl unter 100 Keime/g und entspricht damit den USP21- und DAB9-Normen.

Beispiel 7

Die gesamte Menge des in Beispiel 1 erhaltenen Phospholipid-Gels (50 g) wird mit 42 g 0,2 molarer NaK₂HPO₄-Pufferlösung versetzt und 4 Minuten gerührt. Die entstehende dünnflüssige Dispersion wird mit 8 g Ethanol versetzt und noch 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die Verhältnisse Phospholipide : Ethanol : Wasser betragen 10 : 16 : 74. Die Teilchengröße, gemessen nach der Laserstreuungsmethode, beträgt 204 nm ($\pm 20\%$); die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g.

Beispiel 8

Die gesamte Menge des in Beispiel 2 erhaltenen Phospholipid-Gels (50 g) wird mit 84 g Leitungswasser versetzt, 4 Minuten verrührt und dann 16 g Ethanol zugegeben. Nach einer weiteren Rührzeit von 1 Minute erhält man als Endprodukt eine liposomale Lösung mit 16% Phospholipid-Gehalt und einer mittleren Teilchengröße von 194 nm ($\pm 20\%$). Trotz der Verwendung von Leitungswasser, das üblicherweise mit Mikroorganismen und Salzen verunreinigt ist, enthält das Produkt weniger als 100 Keime/g.

Beispiel 9

50 g des nach Beispiel 3 erhaltenen Phospholipid-Gels werden mit 42 g Salzlösung versetzt, 4 Minuten gerührt, 8 g Ethanol zugegeben und noch 1 Minute gerührt. Die Vesikel in der so entstandenen gebrauchsfertigen liposomalen Lösung weisen einen mittleren Durchmesser von 154 nm ($\pm 20\%$) auf.

Beispiel 10

Analog Beispiel 8 werden der gesamten Gel-Menge aus Beispiel 4 111 g physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Nach 4 Minuten Rühren gibt man noch 24 g 2-Propanol hinzu und rührt 1 weitere Minute. Die mitt-

lere Teilchengröße der Vesikel in der liposomalen Lösung beträgt 122 nm ($\pm 20\%$).

Beispiel 11

Das in Beispiel 5 erhaltenen Phospholipid-Gel wird unter Rühren mit 37 g Pufferlösung (Phosphatpuffer) versetzt, 4 Minuten gerührt, 8 g 2-Propanol zugegeben und noch 1 Minute weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße der Vesikel in der liposomalen Lösung beträgt 187 nm ($\pm 20\%$).

Beispiel 12

Verwendet wird die Gesamtmenge des Gels aus Beispiel 6. Diese wird mit 111 g Phosphatpufferlösung versetzt, 4 Minuten gerührt, 16 g 2-Propanol zugegeben und 1 Minute weitergerührt. Die mittlere Größe der Vesikel in der so erhaltenen liposomalen Lösung beträgt 162 nm ($\pm 20\%$).

Wie in den Beispiel 9 – 15 liegt auch hier die Keimzahl unter 100 Keime/g.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein phospholipidhaltiges Gel und ein Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung für die Herstellung liposomaler Lösungen.

Patentansprüche

1. Phospholipidhaltiges Gel, dadurch gekennzeichnet, daß es mit Alkoholen konserviert ist.
2. Phospholipidhaltiges Gel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial natürliche Phospholipide, die aus Ölsaaten gewonnen werden, verwendet werden.
3. Phospholipidhaltiges Gel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial ein Phospholipidgemisch der Zusammensetzung

80 Gew.-% Phosphatidylcholin
1 – 19 Gew.-% saure Phospholipide
19 – 1 Gew.-% sonstige Phospholipide

verwendet wird.

4. Phospholipidhaltiges Gel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial ein Phospholipidgemisch der Zusammensetzung

60 Gew.-% Phosphatidylcholin
10 – 30 Gew.-% saure Phospholipide,
10 – 30 Gew.-% sonstige Phospholipide

verwendet wird.

5. Phospholipidhaltiges Gel nach den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkohol 2-Propanol oder Ethanol ist.
6. Phospholipidhaltiges Gel nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkoholgehalt in der Gel-Formulierung 15 Gew.-% bis 20 Gew.-%, typischerweise 16 Gew.-% beträgt.
7. Phospholipidhaltiges Gel nach den Ansprüchen 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Phospholipidgehalt im Gel maximal 40 Gew.-%, üblicherweise 20 bis 30 Gew.-% beträgt.
8. Phospholipidhaltiges Gel nach den Ansprüchen 1

bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Phospholipid-Ausgangsmaterial ein flüssiges Phospholipid-Alkohol-Gemisch ist.

9. Verfahren zur Herstellung eines phospholipidhaltigen Gels nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Phospholipid-Alkohol-Gemisch nach den vorgenannten Ansprüchen mit so viel Wasser rührt, daß ein Gel entsteht.

10. Verwendung des phospholipidhaltigen Gels der Ansprüche 1 – 8 zur Herstellung von liposomalen Lösungen.